

PAPEL DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN LA CALIDAD DEL SEMEN DE BOVINOS Y SU REPERCUSIÓN EN LA FERTILIDAD

* Celeste Flores; ** Carlos Medina

PALABRAS CLAVE: Semen. SOD. Estrés oxidativo. Fertilidad.

RESUMEN

El espermatozoide, como toda célula, aprovecha sus nutrientes a través de procesos oxidativos, de los cuales obtiene energía para mantener su viabilidad y funciones. A partir de estos procesos se generan radicales libres (RL) que presentan un electrón desapareado cualidad que los hace muy reactivos, además de tener la capacidad de interactuar con cualquier tipo de moléculas (carbohidratos, lípidos, ADN y proteínas) y de esta manera causar daños estructurales y funcionales en la célula. Los RL son esenciales para que ocurran diferentes procesos fisiológicos, sin embargo, cuando se generan en grandes cantidades pueden causar daño tisular, por tales motivos en semen existen mecanismos antioxidantes, como la enzima Super Oxido Dismutasa (SOD), que controla la concentración de RL. Esta enzima se considera como un elemento esencial para la defensa del semen ante el estrés oxidativo y sus deficiencias generadas por leucocitospermia o deficiencia enzimática hereditaria puede ser la responsable de infertilidad en machos por baja en la calidad seminal, relacionado con aumento en la concentración de RL que afectan la morfología del espermatozoide y su motilidad.

KEY WORDS: Sperm. SOD. Oxidative stress. Fertility.

ABSTRACT

The sperm cell as a whole, takes its nutrients through oxidative processes, which gets energy to maintain their viability and functions. From these processes generate free radicals (RL) having one unpaired electron quality that makes them very reactive, besides having the ability to interact with any type of molecules (carbohydrates, lipids, DNA and proteins) and thus cause structural and functional damage in the cell. Radicals are essential for various physiological processes occur, however, when they occur in large amounts can cause tissue damage, for such reasons exist in sperm antioxidant mechanisms, such as the enzyme superoxide dismutase (SOD), which controls the concentration of RL. This enzyme is considered as an essential element of semen defense against oxidative stress generated by leukocytospermia shortcomings or hereditary enzyme deficiency may be responsible for infertility in males low semen quality related to increased concentration of RL affecting sperm morphology and motility.

* Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales Dr. Haity Moussatché (UNIHM) del Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA), Barquisimeto (Lara, Venezuela). Tel. 0251-2592630.
E-mail: caf06@hotmail.com

** Departamento de Fisiopatología del Decanato de Ciencias de la Salud

INTRODUCCION

Las reacciones de óxido-reducción que ocurren en el organismo son importantes, puesto que los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía libre a partir de ellas ⁽¹⁾, la mitocondria es una estructura clave para este proceso en la célula y aporta el 80% del ATP a través de la combustión de sustrato a través del consumo de oxígeno (85 – 90%) Sin embargo las características del proceso de reducción del O₂, produce intermediarios (radicales libres) capaces de generar importantes alteraciones funcionales ⁽²⁾.

El espermatozoide, como toda célula, aprovecha sus nutrientes (hidratos de carbono, lípidos y proteínas) a través de procesos oxidativos, de los cuales obtiene energía para mantener su viabilidad y funciones, el más importante es el que se lleva a cabo en la mitocondria a través de la cadena respiratoria, principal fuente de ATP y también de radicales libres (RL) ⁽³⁾.

La cantidad de RL es controlada a través de enzimas antioxidantes como la Superoxido dismutasa (SOD) y la Glutathion Peroxidasa (GSH-Px), las cuales están asociada a un oligoelemento (Cu, Fe, Mn, Zn Se), que actúan como cofactores; ambas enzimas se encuentran en el citosol y su función es la reducción del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno, respectivamente, brindando protección a la célula y al organismo.

La deficiencia en el consumo de esos minerales o la presencia de factores que puedan interferir en su metabolismo, especialmente en bovinos mantenidos en pastoreo, ocasionaría una disminución de la actividad enzimática, ⁽⁴⁾, asociada con retención de placenta, diarrea, abortos, partos prematuros y alta mortalidad neonatal ⁽⁵⁾, disminución en la eficiencia reproductiva ⁽⁶⁾, anemia y baja calidad seminal ⁽⁷⁾. Por tales motivos es de gran importancia estudiar el rol de estas enzimas, específicamente la SOD en la calidad seminal de toros y cómo repercute en la fertilidad.

RADICALES LIBRES Y SISTEMA ANTIOXIDANTE

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado, cualidad que los hace muy reactivos y le permite captar un

electrón de otros átomos con el fin de alcanzar estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre sustrae el electrón (reducción) que necesita, la molécula estable que lo pierde (oxidación) se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena, además, debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos vivos ⁽⁸⁾.

En el cuerpo humano, los radicales libres más comunes son el superóxido y el peróxido de hidrógeno que, en su mayoría, suelen ser derivados del oxígeno, debido a que se generan normalmente durante la respiración celular, aunque pueden provenir de ácidos grasos poliinsaturados, de compuestos de sulfhidrilo y de otros compuestos capaces de transferir electrones ⁽⁹⁾.

Los radicales libres derivados del oxígeno son considerados los más importantes radicales producidos por los seres vivos, el radical superóxido es considerado el principal RL porque reacciona con un mayor número de moléculas para formar otras RL secundarios en donde participa directa o indirectamente en reacciones catalizadas por metales de transición entre los que destacan el hierro y el cobre ⁽¹⁰⁾, Seguidamente el anión superóxido, por ganancia de un electrón y acción de la enzima superóxido dismutasa da lugar al peróxido de hidrógeno, que no es un verdadero radical, pero tiene mucha importancia, debido a su capacidad de ganar un electrón y un protón y originar de esta manera el radical de hidroxilo que es un potente oxidante y en presencia de metales (Fe²⁺, Cu²⁺) puede generar el radical hidroxilo ⁽¹¹⁾.

Dentro de los antioxidantes se encuentran enzimas como la Superoxido Dismutasa (SOD) y Glutathion Peroxidasa (GSH-PX), que protegen al organismo contra la formación de nuevos radicales libres y Proteínas de unión a metales como el Glutathion reducido (GR) que frenan la disponibilidad del Fe, necesario para la formación del radical OH ⁽¹²⁾, estos antioxidantes pueden ser citosólicos o de membrana y característicamente requieren de cofactores como el zinc, el magnesio y el cobre, para su buen funcionamiento ⁽¹³⁾.

Las sustancias antioxidantes se han clasificado en dos principales sistemas, el sistema enzimático y el

sistema no enzimático; también conocidos como endógeno y exógeno respectivamente, el primer sistema de defensa correspondiente a las enzimas antioxidantes o endógenas, está basado en un complejo enzimático de defensa que puede incluir la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peróxidasa ⁽¹⁴⁾.

En el caso de la superóxido dismutasa es la primera línea de defensa de las células frente los RL permite la conversión del ión superóxido en peróxido de hidrógeno, y es la enzima que se ha descrito en una amplia variedad de seres vivos multicelulares y unicelular (bacterias) y existen varios tipos de acuerdo al cofactor que se une y su ubicación a nivel celular ⁽¹⁵⁾, la SOD que utiliza manganeso como cofactor se encuentra a nivel mitocondrial (MnSOD), mientras que la que usa Cu y Zn se encuentra a nivel citoplasmático (CuZnSOD). Por su parte la catalasa (CAT) y la glutatión peróxidasa (GSH-PX) transforman el peróxido de hidrógeno en oxígeno no molecular, agua y glutatión oxidado ⁽¹⁶⁾.

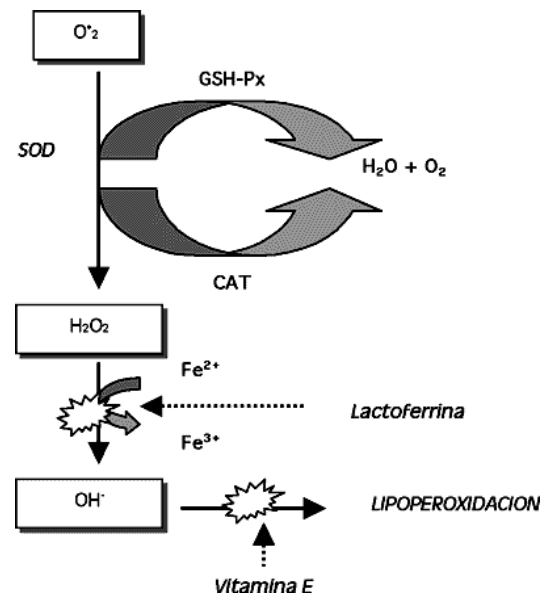
La concentración de RL está determinada por el balance entre la velocidad de producción de especies reactivas y la velocidad de eliminación por compuestos y enzimas antioxidantes, las células cuentan con diversos mecanismos para restablecer el estado redox después de una exposición temporal a concentraciones elevadas de RL, esto genera aumento en los niveles de estas especies reactivas que induce la expresión de genes cuyos productos tienen actividad antioxidante, tales como, enzimas antioxidantes o moléculas que incrementen el transporte de cistina de cistina con el propósito de incrementar los niveles intracelulares de glutatión ⁽¹⁷⁾.

Cuando ocurre un desequilibrio entre los RL y antioxidantes bien sea enzimáticos o no, con un desplazamiento a favor de los primeros, este evento causa estrés oxidativo, esta alteración da lugar a cambios en las biomoléculas y de hecho a modificaciones funcionales en las células afectadas e incluso su muerte ⁽¹⁸⁾. En la actualidad se conoce la existencia de una correlación inversa entre algunos antioxidantes y ciertas patologías, por lo que es de gran importancia las determinaciones de los mecanismos de defensas antioxidantes en los estudios que evalúan el perfil de riesgo de un individuo ⁽¹⁹⁾.

Los RL generados en situación de estrés oxidativo, pueden iniciar procesos patológicos graves y favorecer su progresión debido al impacto que tienen en las proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN; puede inducir un aumento o disminución de su función, en el caso de los lípidos (Lipoperoxidación) de la membrana celular genera problemas en la permeabilidad de la misma y causar la muerte celular de igual manera se ve afectados los carbohidratos y el ADN ^(8, 20).

Las enzimas antioxidantes causan un retardo en la acumulación de los RL y su mal funcionamiento genera descontrol que puede afectar a diferentes procesos esenciales del organismo, siendo una de las piedras angulares en la génesis de distintas patologías (ver figura 1) ⁽²¹⁾.

Figura 1. Radicales Libres y enzimas antioxidantes



Fuente: Castillos y col 2001

El daño oxidativo a los tejidos representa el punto final común de múltiples enfermedades y condiciones patológicas, existen crecientes evidencias que señalan al estrés oxidativo como un factor significativo involucrado en la etiología de la infertilidad masculina, pues provoca la pérdida de las funciones espermáticas por causa de la generación excesiva de RL o a la disminución de la actividad antioxidante del semen ⁽²²⁾.

SISTEMA ANTIOXIDANTE Y CALIDAD DEL SEMEN

El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino y los estudios actuales sobre contrastación seminal que persiguen como objetivo final identificar algún parámetro cinético, morfológico o bioquímico que indique el estado de la célula espermática en un momento dado y que al mismo tiempo, pueda ser correlacionado con la fertilidad y calidad del eyaculado ⁽²³⁾. En toros los parámetros considerados para evaluar la calidad seminal son, motilidad espermática que es evaluada en masa (motilidad masal) y de manera individual, esta última debe seguir un movimiento más o menos rectilíneo (motilidad progresiva), además, se estudia la morfología espermática con la coloración de KARRAS y microscopio de luz y objetivo de inmersión para clasificar las anomalías en mayores y menores, primarias y secundarias, otro elemento a evaluar es el acrosoma para determinar su presencia o ausencia. Por otro lado es evaluada la vitalidad espermática, mediante colorante supravital (Eosina-Nigrosina), y frotis fino con el propósito de determinar el porcentaje de espermatozoides muertos (coloreados) y vivos (no coreados) ⁽²⁴⁾.

En el caso del semen las fuentes principales de RL son a partir de los espermatozoides inmaduros, inmóviles y/o morfológicamente anormales, de los leucocitos infiltrados en el semen y de los espermatozoides morfológicamente normales pero funcionalmente anormales ⁽²⁵⁾.

Aunque los RL juegan un papel muy importante para el funcionamiento normal del espermatozoide ⁽²⁶⁾, su producción incontrolada tiene un efecto nocivo para las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos), lo que genera alteración de los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.) ⁽¹⁾, por esta razón, existen mecanismos antioxidantes para contrarrestar la producción excesiva de RL o disminuir su reactividad ⁽²⁶⁾ estos mecanismos consisten en sustancias no enzimáticas (Vitamina C, Vitamina E y el glutatión) y de tipo enzimático (SOD, catalasas, glutatión peroxidasas, etc.) ⁽³⁾.

Los espermatozoides son vulnerables al daño oxidativo de los RL porque poseen en su membrana plasmática un alto contenido de ácidos grasos polinsaturados necesaria para mantener la fluidez de membrana importante durante la fertilización, niveles altos de RL pueden aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide, causando diversas anomalías en la morfología espermática alterando así la fertilidad masculina ⁽²⁵⁾.

De igual manera, la lipoperoxidación de la membrana se correlaciona con la disminución de la motilidad espermática y con los defectos morfológicos del cuerpo de los gametos masculinos incluso la muerte ⁽²²⁾ y desde el punto de vista clínico la cuantificación de la lipoperoxidación tiene gran relevancia debido a que es la principal responsable en la alteración de función espermática, dentro de las que se incluye daño en el ADN ⁽²⁸⁾.

Además, la disminución de motilidad espermática pudiera estar relacionada con cambios en la configuración y en consecuencia en la dimerización de las proteínas contráctiles que se encuentran a nivel del flagelo del espermatozoide y de esta manera su función. Algo similar se ha visto en el tejido cardíaco donde incluso niveles altos de la enzima SOD es inversamente proporcional a la función ventricular izquierda, incluso pudiera ser utilizado como un marcador para la valoración del daño isquémico ⁽²⁹⁾.

En humanos la enzima SOD es de gran importancia a nivel reproductivo que incluso al estar en bajas concentraciones puede causar infertilidad, este fenómeno se ha visto en pacientes con leucocitospermia ⁽³⁰⁾ y en pacientes con infertilidad sin causas aparentes, donde la única alteración observada es la disminución de las concentraciones de SOD a nivel del plasma seminal con un posible origen genético ⁽²⁵⁾ incluso su actividad puede ser utilizada como predictora del tiempo de vida de una muestra particular ⁽³⁰⁾.

El RL superóxido que es dismutado por la SOD surgen de la reducción enzimática controlada de un electrón del oxígeno molecular, proceso que se lleva a cabo durante la respiración celular normal y en su fase final se combina con el hidrógeno para formar agua y ATP. Este camino de reducción del oxígeno lleva a la producción de radicales libres en un 4 a 5%

del oxígeno utilizado, los cuales son contrarrestados por las enzimas antioxidantes, sin embargo, la actividad física vigorosa puede incrementar el consumo de oxígeno en 10 a 15 veces por encima del valor de reposo con el propósito de satisfacer las demandas de energía, esto ocasiona, un desbalance entre la producción de RL y el sistema antioxidante enzimático ⁽³¹⁾.

Los espermatozoides presentan una alta tasa metabólica y la más importante fuente de energía es la que se lleva a cabo a través de procesos oxidativos en la mitocondria a través de la cadena respiratoria, la cual requiere para mantener su viabilidad y funciones, sin embargo también es la principal fuente de RL ⁽³⁾. Lo anteriormente expuesto, hace pensar que la cantidad del RL superóxido producidos por los espermatozoides es elevada, por lo que se requiere altas concentraciones de la enzima SOD para contrarrestarlo.

Por otro lado, SOD es esencial para la defensa contra la toxicidad causada por leucocitospermia que aparece en infecciones genitales que se ha asociado a generación de RL y disminución de la calidad seminal por producción de citocinas proinflamatorias (interferón gamma y otras), que pueden interactuar con los RL en los procesos de destrucción tisular y estimular la lipoperoxidación de la membrana espermática, además, los procesos inflamatorios alteran los mecanismos antioxidantes, como lo es la SOD, uno de los elementos principales en la protección de los espermatozoides contra el estrés oxidativo, que además de estar presente en los espermatozoides es producida por la próstata y el epidídimo, una disminución en su producción en estas áreas pudiera estar relacionada con el efecto dañino de los procesos inflamatorios en vías espermáticas lo que afecta la función de las glándulas sexuales accesorias ⁽³⁰⁾.

La deficiencia en el consumo de minerales que actúan como cofactores de la enzima SOD, pudiera ocasionar una disminución en actividad enzimática, esto ha sido observado en bovinos y relacionado con la cantidad y calidad de los forrajes suministrados en la dieta ⁽³²⁾, incluso en animales bajo condiciones de pastoreo, la actividad de la SOD sérica puede emplearse como indicador del balance metabólico nutricional de Cu, Mn y Fe en bovinos y no está clara aun su relación con Zn ⁽³³⁾. La actividad de la SOD a nivel sérico puede estar influenciada por la

concentración de cofactores y la síntesis podría estar aumentada a nivel de las glándulas sexuales accesorias y en el testículo ⁽³⁴⁾. Sin embargo, estudios realizados en animales sanos de diferentes especies (cerdos, bovinos, caninos y equinos) revelan que la actividad de la enzima SOD en sangre, suero no se encontró correlación entre las concentraciones a nivel seminal, lo que sugiere que actúan como sistemas independientes ⁽³⁵⁾.

CONCLUSION

Como se puede observar, la actividad de la SOD se ve influenciada por diferentes factores y tiene participación importante en la calidad seminal en diferentes especies animales incluyendo al hombre, sin embargo, su comportamiento y concentración a nivel de plasma seminal no está bien dilucidado por lo cual, se debe estudiar con mayor profundidad los diferentes subtipos de SOD que tienen mayor importancia biológica por su posible papel en la calidad del semen de bovino y de esta manera buscar elementos que ayuden a garantizar animales con alta eficiencia reproductiva e incluso con calidad de exportación, de igual manera, este nuevo conocimiento permitirá elaborar nuevos diluyentes que ayude a contrarrestar los efectos deletéreos de los RL que se observan en el semen conservado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. GUERRA E. Estrés Oxidativo, Enfermedades Y Tratamientos Antioxidantes. Med. Interna An. Med. Interna, 2001; 18(6): 326 – 35. <http://scielo.isciii.es/pdf/ami/v18n6/revision1.pdf>.
2. COIRINI. H. Toxicidad Del Oxígeno Y Radicales Libres. http://Www.Fmv-Uba.Org.Ar/Grado/Medicina/Ciclo_Biomedico/Segundo_A%C3%B1o/Bioquimica/Toxicidad.Pdf.
3. VILLA C. Enfoques Sobre Semen, Estrés Oxidativo Y Antioxidantes. Taurus, Bs. As., 2009; 11(43): 34 – 38. www.Produccion-Animal.Com.Ar
4. WICHTEL, J.J.; CRAIGIE, A.L.; FREEMAN, D.A.; VARELAALVAREZ, H.; WILLIAMSON, N.B. Effect Of Selenium And Iodine Supplementation On Growth Rate And On Thyroid And Somatotropic Function In Dairy

- Calves At Pasture. *Journal of Dairy Science*. 1996; 79: 1865 – 72.
5. MILLER JK, E BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, FC MADSEN. 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci* 76, 2812 – 2823.
 6. CAMPBELL, M. H., J. K. MILLER. 1998. Effect Of Supplemental Dietary Vitamin E And Zinc On Reproductive Performance Of Dairy Cows And Heifers Fed Excess Iron. *J. Dairy Sci.* 81: 2693 – 2699. <http://Bases.Bireme.Br/Cgi-Bin/Wxislind.Exe/Iah/Online/?Isiscript=Iah/Iah.Xis&Nextaction=Lnk&Base=Medline&Exprsearch=9812274&Indexsearch=Ui&Lang=E>
 7. UNDERWOOD, E.J. and Suttle, F. (1999) *The Mineral Nutrition of Livestock*, 3rd edn. CAB International, Wallingford, UK.
 8. MALDONADO O, JIMÉNEZ E, BERNABÉ M, CEBALLOS G, MÉNDEZ E. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev Méd UV* 2010 10(2): 32 – 9.
 9. GIL N, GÓMEZ J, GÓMEZ A. Radicales libres y lesión cerebral. *Univ. Méd.* 2008; 49 (2): 231 – 242.
 10. LUNA A. Mecanismos Endógenos De Generación De Especies Reactivas De Oxígeno Y Respuesta Celular Antioxidante Ante El Estrés Oxidativo <http://Www.Geriatria.Salud.Gob.Mx/Descargas/8.Pdf>.
 11. DORADO LAMBERT A, REVILLA MONTERO J. Radicales Libres De Oxígeno Y Distres Respiratorio Agudo. *Rev Cubana Pediatr* 2000; 72 (3) 214 – 9.
 12. RODRÍGUEZ J, MENÉNDEZ Y. Trujillo y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit* 2001; 30(1): 36 – 44.
 13. LOZADA S M, GARCÍA L. Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. 2009; 17: 172 – 9.
 14. ZAMORA J. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Rev. Chil. Nutr.* V.34 N.1 Santiago Mar. 2007. [Ttp://Dx.Doi.Org/10.4067/S0717-7518200700010000](http://Dx.Doi.Org/10.4067/S0717-7518200700010000).
 15. ROSALES PATRICIA. Papel de las actividades sod y catalasa en la virulencia de *Photobacterium damsela* subesp. piscicida: estrategias para estimular el estallido respiratorio de lenguados cultivados. Tesis doctoral. 2006. Universidad de Malaga. Facultad De Ciencias. Departamento de Microbiología. <http://Www.Biblioteca.Uma.Es/Bbldoc/Tesisuma/1676917x.Pdf>
 16. CASTILLO, C, BENEDITO J, LÓPEZ-ALONSO M, MIRANDA M, HERNÁNDEZ J. Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Arch. Med. Vet.* 2001; 33 (1).
 17. DORADO CLAUDIA, RUGERIO C, RIVAS. A Estrés Oxidativo Y Neurodegeneración. *Rev Fac Med Unam* 2003; 46(6): 229 – 35.
 18. HERNÁNDEZ. LIMA L. Estrés oxidativo y antioxidantes: actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos. Universidad de la Habana. http://Www.Sld.Cu/Galerias/Pdf/Sitios/Mednat/Estres_Oxidativo_Y_Antioxidantes.Pdf.
 19. MAYOR R. Estrés Oxidativo Y Sistema De Defensa Antioxidante. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2010; 5(2): 23 – 29.
 20. MONTALVO E, GARCIA M, ESCALANTE T, PENA- SANCHEZ J, VÁZQUEZ-MEZA H. Características Bioquímicas y nivel de lipoperoxidación en el precontecimiento hepático. *Cir cir* 2011; 79: 132 – 40. http://www.artemisaenlinea.org.mx/acervo/pdf/cirugia_cirujanos/6Caracterizacionbioquimica1.pdf
 21. RAMÍREZ I. Efecto De La Administración Oral De Extractos Vegetales Con Actividad Antioxidante, Sobre Los Niveles Sanguíneos De Glutathion Peroxidasa En La Rata. 2004. Universidad De San Carlos De Guatemala Facultad De Ciencias Químicas Y Farmacia. Para Optar Al Título De Química Bióloga. [Http://Biblioteca.Usac.Edu.Gt/Tesis/06/06_2263.Pdf](http://Biblioteca.Usac.Edu.Gt/Tesis/06/06_2263.Pdf)

22. ALBA L, MONZÓN G, PELÁEZ LUÍS y QUINTERO Y. Papel del estrés oxidativo en la infertilidad masculina. *Rev Cubana Invest Biomed* 2000; 19(3): 202 – 5.
23. HIDALGO C, TAMARGO C, DÍEZ C. Análisis del semen bovino <http://Ria.Asturias.Es/Ria/Bitstream/123456789/192/1/Analisis%20semen%20bovino.Pdf> . Información Ganadera.
24. OLIVERA ANGELINO, CANSECO RODOLFO. Manual de evaluación de semen en bovinos. Trabajo Practico Educativo para Obtener el Título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad de Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnista. Veracruz-México. <http://Cdigital.Uv.Mx/Bitstream/12345678/147/1/Jose%20nicolas%20angelino%20olivera.Pdf>
25. TORTOLERO I, ARATA-BELLABARBA G, ALFONSO J, GÓMEZ R, REGADERA J. Estrés oxidativo y función espermática. *Rev Venez Endocrinol Metab* 2005; 3 (3): 12 – 19.
26. GALLARDO J. Evaluación del sistema antioxidante en semen normal. *Rev Invest Clin* 2007; 59 (1): 42 – 47.
27. PALAMANDA J. , KEHRE J. Inhibition Of Protein Carbonyl Formation And Lipid Peroxidation By Glutathione In Rat Liver Microsomes. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 1992; 293(1) 14 February, Pages 103 – 109.
28. BOUVE B, PAPARELLA C, FELDMAN N. Relación del estrés oxidativo con la funcionalidad espermática en hombres con infertilidad idiopática. *Revista Bioquímica y Patología Clínica* 2007; 71(3): 29 – 32.
29. CÉSPEDES C Y SÁNCHEZ D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev Cubana Cardiol* 2000; 14(1): 55 – 60.
30. QUINTERO W, MALLEA L, MACHADO A, LLOPIZ N, CÉSPEDES E, YEPES S, MONZÓN G, FONTANELA M y ACOST J. Relación entre las distintas subpoblaciones celulares, la enzima superóxido dismutasa y la calidad seminal. *Rev Cubana Invest Biomed* 2002; 21(2): 81 – 5.
31. DEL CASTILLO V. Antioxidantes, radicales libres y ejercicio. *Revista Digital Buenos Aires* 2000; 5 (23). <http://www.efdeportes.com/efd23/radic.htm>.
32. FLORES, C.1; MÁRQUEZ, Y.1; VILANOVA, L.2; MENDOZA, C.1 Dienos conjugados y malondialdehído como indicadores de lipoperoxidación en semen de toros “Carora”. *Rev. vet.* 22: 2, 91 – 94, 2011.
33. JARAMILLO S, VILLA N, PINEDA A, GALLEGÓ Á, TABARES P y CEBALLOS A. Actividad sanguínea de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en novillas a pastoreo. *esq. agropec. bras* 2005; 40(11): 1115 – 21.
34. VILLA N, CASTAÑO D, DUQUE P, CEBALLOS A. Actividad de la Glutatión Peroxidasa y la Superóxido Dismutasa en sangre y plasma seminal en caballos colombianos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2012; 25(1): 64 – 70.
35. VILLA-ARCILA N, CEBALLOS-MARQUEZ A, DUQUE-MADRID P, RESTREPO-RESTREPO L. Determinación Del Estado Antioxidante En Sangre, Suero Y Plasma Seminal En Caninos *Vet.Zootec.* 4(2): 30 – 36, 2010.